



辽宁科协资助

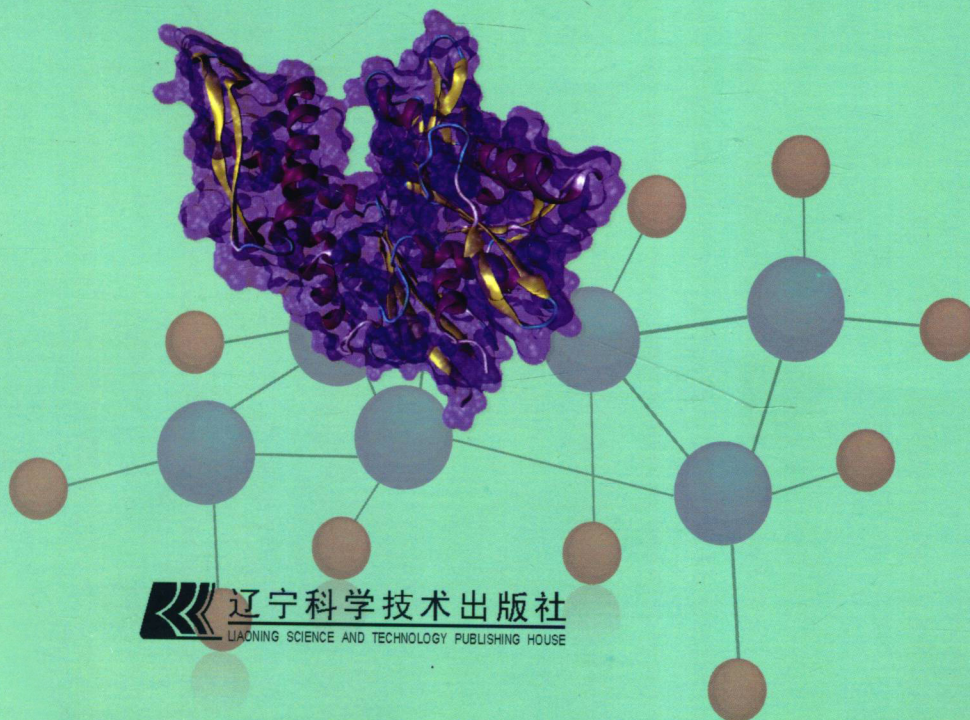
LIAONING KEXIE ZIZHU

辽宁省优秀自然科学著作

● 宋有涛 著

分子伴侣与蛋白质 错误折叠

Molecular Chaperones and Protein Misfolding



辽宁科学技术出版社

LIAONING SCIENCE AND TECHNOLOGY PUBLISHING HOUSE



● 蛋白质 卷

蛋白质与蛋白质相互作用 蛋白质与核酸相互作用 蛋白质与脂类相互作用 蛋白质与无机离子相互作用 蛋白质与有机分子相互作用 蛋白质与生物大分子相互作用 蛋白质与生物小分子相互作用 蛋白质与生物无机物相互作用 蛋白质与生物有机体相互作用 蛋白质与生物环境相互作用

分子伴侣与蛋白质 错误折叠

Molecular Chaperones and Protein Misfolding



辽宁省优秀自然科学著作

分子伴侣与蛋白质 错误折叠

宋有涛 著

辽宁科学技术出版社

沈 阳

© 2012 宋有涛

图书在版编目(CIP)数据

分子伴侣与蛋白质错误折叠 / 宋有涛著. —沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2012.3

(辽宁省优秀自然科学著作)

ISBN 978-7-5381-7398-7

I. ①分… II. ①宋… III. ①分子生物学—研究
IV. ①Q7

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第034902号

出版发行: 辽宁科学技术出版社

(地址: 沈阳市和平区十一纬路29号 邮编: 110003)

印刷者: 沈阳新华印刷厂

经销者: 各地新华书店

幅面尺寸: 185mm × 260mm

印 张: 12.75

字 数: 270千字

印 数: 1 ~ 2000

出版时间: 2012年3月第1版

印刷时间: 2012年3月第1次印刷

责任编辑: 李伟民 陈 刚

封面设计: 嵘 嵘

责任校对: 王春茹

书 号: ISBN 978-7-5381-7398-7

定 价: 30.00元

联系电话: 024-23284360

邮购热线: 024-23284502

<http://www.lnkj.com.cn>

《辽宁省优秀自然科学著作》评审委员会

主 任：

康 捷 辽宁省科学技术协会党组书记、副主席

执行副主任：

黄其励 东北电网有限公司名誉总工程师

中国工程院院士

辽宁省科学技术协会副主席

副主任：

金太元 辽宁省科学技术协会副主席

宋纯智 辽宁科学技术出版社社长兼总编辑 编审

委 员：

郭永新 辽宁大学副校长

陈宝智 东北大学安全工程研究所所长

刘文民 大连船舶重工集团有限公司副总工程师

李天来 沈阳农业大学副校长

刘明国 沈阳农业大学林学院院长

邢兆凯 辽宁省林业科学研究院院长

辽宁省科学技术协会委员

吴春福 沈阳药科大学校长

辽宁省科学技术协会常委

张 兰 辽宁中医药大学附属医院副院长

王恩华 中国医科大学基础医学院副院长

李伟民 辽宁科学技术出版社总编室主任 编审

自序

三十年前，当一个穿白大褂、戴黑眼镜、手握试管的生物学家是我在锦西县（现在的葫芦岛市）读实验小学时的理想，我非常感谢我当时的班主任高素坤老师在我只懂得语文和数学时对我这个理想的诱导和扶持。实验小学的教育方式让我更喜欢在课外自学更多的学习内容，我还记得当年的课本上印着的“黑山北关实验教材”的字样，这使我迄今仍受益匪浅。从小学四年级上自然课开始，我便喜欢上动植物这些东西，在这里我接受了生物学研究的启蒙教育。

在入门时期，一个必须感谢但是我并不太喜欢的师长是我在初三的班主任郝翰君老师，他对学生过于的严厉、寡笑让我现在还头皮发颤，但他在生物学授课上的才技让我深深佩服也让我喜欢上了生物。结果，中考生物满分让我顺利地通过了我的理想的第一道门槛。高考前选择生物学专业完全是自己个性的决定。当时计算机专业最热，建筑学专业最实用，父母希望我能学医学，而我仿佛想到了十几年前的那个理想，毅然地选择了生物学专业。其实，现在想想当时生物学专业也是很热的，从我们这些“七零后”开始的出国潮的代表专业就是生物，这也许是我选择生物的一个客观原因。

非常感谢我在南开大学时受到的生物学教育。我学的是微生物专业，虽然没有进入我的第一志愿分子生物学专业，但从发展的角度来说，这对我后来在分子生物学领域的发展提供了一个坚实的理论和实验基础。这个时期对我引导最大的是给我们主讲细胞生物学一位副教授，可惜我竟想不出他的名字。他年轻、潇洒、博学、亲切，并刚从日本京都大学毕业获得博士学位。潜移默化，他的经历为我指明了我学业上的下一个前进方向——日本。因为当时看来，学生物出国是必须地。

在客观上，我能去日本读生物学硕士、博士最要感谢的是我的父亲，因为他当时在山口大学做访问学者。现在看来，山口市的静谧、幽美、清淡、

和谐的自然社会环境非常适合做科研工作，因为在那里好像除了科研没有更有趣的事情可做。在我生物學研究中真正的第一个导师加藤昭夫教授的指导下，我在实验室、自习室和导师的办公室穿梭了将近七年的时间，最后发表了5篇第一作者的SCI英文论文，总的感想是“很累，很充实，很开心”。从这个时候开始，分子伴侣、蛋白质错误折叠和淀粉样聚集在我的心中刻下了深深地烙印。

拿到博士学位后，没有选择，美国是必须要去的，博士后是必须要做的。我工作的单位美国国家卫生研究院（NIH）有点像中国的科技部加上科学院，一个既管发科研经费又管做科研的部门（一直有国人抨击美国的科研管理体制的这个问题），但是一个不容置疑的事实是世界上三分之二的诺贝尔生理和医学奖的获得者在NIH工作过或得到过NIH的资助。在这里我继续分子伴侣、蛋白质错误折叠和淀粉样聚集的研究，只不过研究的蛋白换了一个熟悉而惊人的名头——朊病毒。我的大老板Reed Wickner是美国科学院院士，当时国际上酵母朊病毒研究的一把手。但他给我最深的印象是一位邻家和蔼的老头，T恤、牛仔裤加上旅游鞋是他大半年的行头，他对我的最大教诲是“学术面前，人人平等”。我的直接老板Daniel Masison是一位亲切、可敬、民主的兄长，他做学术非常的严谨，这一点对我影响很大。做了三年博士后要离开他的实验室的时候，我说“我要走了”，他问“这里不好吗”，我说“好，但我要当老板”，他说“那你应该走”成为一个经典难忘的对白。

2005年底，我带着在十年国外积累的15篇SCI论文，来到了辽宁大学生命科学院任教，成为辽宁大学历史上最年轻的教授之一。回顾回国后的生活，平心而论，虽然国内的科研条件相对一般，但我个人很喜欢国内的环境，因为满目看到的都是快速发展。以辽宁大学生命科学院为例，五年间国家自然科学基金从“零”增加到10项，科研经费从20万元/年增加到300万元/年，省级重点科研平台从“零”增加到3个，硕士点从1个增加到全学科覆盖。虽然对我自身、对我工作的单位来说，距离人生一个又一个的顶峰还有很长的路要走，但我很喜欢在这里和一大批积极向上同志们共同工作的激情。在这里，我一如既往地继续着分子伴侣、蛋白质错误折叠和淀粉样聚集的研究。

为了纪念这十五年来科研历程，也为了感谢在我成为一名生物学者的成长过程中一直关心我、帮助我的家人、严师和挚友，我把这个时期相关的科研成果撰写成文，写作过程中也深深体验到了一个理科的实验工作者舞文

弄墨的艰辛。再一次感谢我周围的人对我人生中第一本学术专著问世的帮助和鼓励，我仅以此书献给我在南开大学、日本山口大学、美国国家卫生研究院、辽宁大学的老师、同学、同事以及近四十名研究生们。

最后，我想到了不久前我为辽宁省动物资源与疫病防治重点实验室作词的一首实验室室歌，把它献给本书所有的读者们，献给所有曾经年轻和正在年轻的理工科科研工作者们。

追逐梦想

走过青涩的成长 背上昨日的行囊
让你我走到一起揭开人生新的篇章
怀抱共同的梦想 追逐明日的阳光
即使一路荆棘坎坷 也改变不了年轻的信仰

推开希望的窗 共享同一缕阳光
用你我的双手托起我们执著的梦想
历练成熟的翅膀 让我勇敢去飞翔
拥有那坚毅力量 一切也不会被阻挡

I don't care where I was from, but I do know where I wanna go

只知道努力的奔跑就会飞的更高
我不知道这梦有多好 只知道那执著让我忘不掉
那汗水浇注的辉煌就是永恒 就是永恒

宋有涛

2011年3月

前 言

蛋白质折叠是一个极其复杂的过程,近年来蛋白质错误折叠与聚集成为蛋白质化学与分子医学中最具意义的领域之一。蛋白质错误折叠能够引发许多疾病,这些疾病大多是淀粉样沉积疾病,例如疯牛病、阿尔茨海默病、帕金森病、2型糖尿病和亨廷顿病等。淀粉样蛋白沉积疾病的共同特征是,纤维化聚合物成为细胞内含物或细胞外淀粉物出现,其聚合的分子基础是:蛋白错误折叠、特定多肽链丢失或蛋白不能形成天然紧密包装的三维结构。在这些非天然状态中,蛋白包装松散,疏水核心暴露在溶剂中,使其形成富含 β 结构聚合物的趋势大大增强,并且形成的聚合物能作为模板,进而增加了聚合物的大小,最终导致纤维状聚合物的形成。另外,除了已知的淀粉样疾病外,研究表明很多分子起源不明的变性疾病(无论是散发的还是家族的)和多种类型癌症的分子机制也可能与一些蛋白在细胞内外发生错误折叠而引起的聚合有关。虽然不是所有的研究都支持这个观点,但是相当数量的研究者提出了蛋白质错误折叠疾病是更普遍疾病的观点,而且能够解释很多病理学问题。

过去十几年关于蛋白聚合和累积毒性分子基础和发生率的研究,再次评价了其在生物学和药学上的重要性。在细胞内,这些分子伴侣不仅可以调控蛋白质合成后的折叠,同时对许多发生了错误折叠蛋白的聚集-降解同样具有调控作用。因此研究蛋白质错误折叠与分子伴侣的关系不仅可以阐明蛋白质错误折叠疾病的病理学分子基础和生化基础,而且这些信息对于发展针对这些疾病的治疗措施也将具有很大的价值。

近年来随着现代分子生物学、生物化学和细胞生物学技术的日趋成熟,有关分子伴侣对于蛋白质错误折叠调控的研究获得了迅速的发展。我国有关这个方面的专著很少,以往有关的书籍也很少涉及这类新的内容。无论从事生物学、医学和药学基础研究的科研人员,还是大专院校相关专业的师生,都迫切需要一本能够较全面反映包括分子伴侣与蛋白质错误折叠内容的参考书。

本书是作者15年来研究成果的汇总,内容基本上涵盖了作者在日本山口大学7年、美国国家卫生研究院3年以及回国后在辽宁大学工作5年的最新科研成果。本书所包含的二十余篇SCI收录的学术论文主要发表在美国的《Molecular and Cellular Biology》、《The Journal of Biological Chemistry》、《Genetics》、《Protein Science》、《Eukaryotic Cell》和欧盟的《Federation of European Biochemical Societies Letters》等国外高水平学术期刊上,并被《Nature》、《Nature Biotechnology》、《Nature Reviews Microbiology》、《Annual Review of Genetics》和《Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America》等权威SCI收录期刊上的学术论文引用300余次。因此,本书的第一个特点就是新颖和集成,这些研究成果在以往为数不多的有关分子伴侣与蛋白质错误折叠的专著中很少系统性地提及。另外,虽然作者在分子伴侣与蛋白质错误折叠领域研究的内容比较广泛,但还是不可能涵盖该领域的所有内容。本书将对该领域所涉及的内容进行全面系统的介绍,虽然多数内容是作者自己的研究成果,但有些内容是作者根据所在的研究团队的研究成果去粗取精汇编而成。本书从学科特点和获取知识的规律出发,由近及远,由浅入深,以点带面,力求做到系统和全面。所以,本书的另一个特点是综合性强,比较适合于自学。

本书共分9章。第1章绪论,主要包括迄今的蛋白质折叠、淀粉样蛋白沉积疾病和分子伴侣与蛋白质折叠的研究概况。第2章为几种淀粉样蛋白的分子生物学及分子动力学特性。第3章为细胞内糖基化对淀粉样蛋白聚集的抑制作用。第4章为内质网中钙连蛋白对糖基化溶菌酶的质量控制作用。第5章为内质网中Eps1p对含有二硫键蛋白的质量控制作用。第6章为细胞质中Hsp70对酵母朊病毒淀粉样聚集的调控作用。第7章为细胞质中Hsp70辅助伴侣对酵母朊病毒淀粉样聚集的调控作用。第8章为细胞质中的Hsp104对酵母朊病毒淀粉样聚集的调控作用。第9章为应用实例,通过Hsp70修饰建立高灵敏度抗朊病毒药物筛选模型。本书内容主要包括了作者近年来的五项创新性研究成果:一是首次在酵母细胞中发现并证明了分子伴侣钙连蛋白对于淀粉样变异型糖蛋白溶菌酶的质量控制功能;二是首次在酵母细胞中发现并证明了分子伴侣Eps1p对于含有二硫键的淀粉样倾向蛋白朊抑素的质量控制功能,并直接验证了Eps1p在内质网中的质量控制功能假说;三是首次揭示了不同物种、不同结构功能区域的Hsp70对于朊病毒的形成调控基础,这为研究朊病毒的种间屏障提供了一个创新的角度;四是首

次从基因的角度对于影响朊病毒的辅助分子伴侣（因子）进行了系统的研究，进一步细化了分子伴侣对于朊病毒形成、传播的重要调控作用假说；五是创新地构建了对细胞内及细胞外变化高灵敏的SSA1-21酵母菌株和可用于在活体细胞内实时定量检测分子伴侣对于朊病毒的调控作用的NGMC酵母菌株，提高了研究方法的可靠性。

本书的出版得到了辽宁省科学技术协会优秀自然科学专著出版基金的资助。其部分研究内容得到了国家自然科学基金项目（30970152，30600113）、教育部人文社会科学研究项目（08JC790053）、教育部留学回国人员科研启动基金（教外司留[2007]1108）、辽宁省教育厅优秀人才计划（2009R26）、辽宁省教育厅重点实验室项目（20085100）、辽宁省自然科学基金（20072002）、辽宁大学人才引进启动基金（2005003）、日本科学协会SA-SAGAWA 科学研究基金（12-169）的支持。

作者十分感谢其在日本山口大学的博士生导师加藤昭夫教授、美国国家卫生研究院的博士后导师Daniel C. Masison高级研究员及实验室主任美国科学院院士Reed B. Wickner多年来的热心指导，感谢辽宁大学生命科学院和辽宁省动物资源与疫病防治重点实验室的相关教师的大力支持和帮助，感谢辽宁科学技术出版社的编辑为本书出版付出的辛勤劳动。另外，在本书撰写期间，我所指导的研究生宫雅楠、徐利楠、孙晓霞、王莹、陈应广、卜祥龙、王浩等都曾帮助过笔者收集资料、整理、校对，做了大量繁琐的工作。在此对他们的鼎力相助表示由衷的感谢！

在本书写作过程中，作者参阅了许多国内外有关方面的学术论文、综述，得到了许多信息和启发，受益匪浅，参考的文献均在本书参考文献中列出，在此书出版之际向文献的被引用作者们表示衷心的感谢！

本书可作为国内研究分子伴侣及蛋白质错误折叠学者的参考用书，希望本书能够为我国蛋白质错误折叠疾病的进一步研究作出绵薄贡献。由于本书研究属于生命科学领域的热点和前沿科学问题，研究难度较大，其中许多问题仍在研究和探索阶段，加之作者水平有限，虽经几次修改，但难免有许多不足和缺陷，敬请读者、专家、同行朋友惠予指正。

宋有涛

2011年3月

目 录

第1章 绪 论	001
1.1 蛋白质折叠概况	001
1.2 淀粉样蛋白沉积疾病	006
1.3 分子伴侣与蛋白质折叠	011
参考文献	017
第2章 几种淀粉样蛋白的分子生物学及分子动力学特性	021
2.1 研究淀粉样蛋白的细胞水平模型	021
2.2 研究淀粉样蛋白的蛋白水平模型	022
2.3 溶菌酶的分子生物学及结构特性	023
2.4 朊抑素的分子生物学及分子动力学特性	028
2.5 酵母朊病毒 [PSI ⁻] 的分子生物学及分子动力学特性	036
参考文献	045
第3章 糖基化修饰对淀粉样蛋白聚集的抑制作用	049
3.1 蛋白质糖基化修饰研究概况	049
3.2 糖基化对鸡溶菌酶淀粉样突变体聚集的抑制作用	051
3.3 糖基化对鸡朊抑素聚集的抑制作用	054
参考文献	058
第4章 内质网中钙连蛋白 Cne1p 对糖基化溶菌酶的质量控制作用	060
4.1 内质网中分子伴侣对蛋白质折叠调控的研究概况	060
4.2 钙连蛋白的特性及作用机制	063
4.3 酵母细胞中钙连蛋白对糖基化溶菌酶的质量控制	066
参考文献	073
第5章 内质网中PDI家族Eps1p对含有二硫键蛋白的质量控制作用	077
5.1 PDI的研究概况	077
5.2 酵母细胞中Eps1p对鸡溶菌酶的质量控制作用	080

5.3 酵母细胞中 Eps1p 对鸡朊抑素的质量控制作用	083
参考文献	085
第6章 细胞质中的 Hsp70 对酵母朊病毒淀粉样聚集的调控作用	087
6.1 细胞质中分子伴侣对蛋白质折叠调控的研究概况	087
6.2 Hsp70 的研究概况	092
6.3 Ssa1p 对酵母朊病毒 [PSI ⁺] 代谢的调控作用	098
6.4 Ssb 对酵母朊病毒 [PSI ⁺] 的功能研究	112
6.5 不同生物来源的 Hsc70 和 Hsp70 对于酵母朊病毒 [PSI ⁺] 的调控影响	117
参考文献	125
第7章 细胞质中 Hsp70 辅助伴侣对酵母朊病毒淀粉样聚集的调控作用	130
7.1 Hsp70 辅助伴侣 (因子) 的研究概况	130
7.2 辅助分子伴侣 Hsp40 对酵母朊病毒 [PSI ⁺] 聚集的调控作用	132
7.3 核苷酸释放因子对酵母朊病毒 [PSI ⁺] 聚集的调控作用	136
7.4 TPR 辅助分子伴侣对酵母朊病毒 [PSI ⁺] 聚集的调控作用	139
参考文献	153
第8章 细胞质中的 Hsp104 对酵母朊病毒淀粉样聚集的调控作用	158
8.1 Hsp104 的研究概况	158
8.2 Hsp104 对酵母朊病毒 [PSI ⁺] 繁殖的调控作用	161
参考文献	170
第9章 应用实例——通过 Hsp70 修饰建立高灵敏度抗朊病毒 药物筛选模型	173
9.1 抗朊病毒药物筛选模型的研究概况	173
9.2 目前基于酵母细胞的抗朊病毒药物筛选模型的缺陷	174
9.3 研究设计与实验方案	176
9.4 研究意义	179
参考文献	180
常用英文名词缩写	183
本书引用作者的论文目录	188

第1章 绪论

1.1 蛋白质折叠概况

一个有活性的蛋白质分子不但有特定的氨基酸序列，还具有特定的由氨基酸序列决定的三维空间结构。三维结构的完整性受到干扰，生物活性也会发生变化；有时即使只是轻微的破坏，也能导致其生物活性全部丧失，所以蛋白质的生物功能是与其三维空间结构密切联系在一起的。

遗传信息从DNA转录到RNA，然后在核糖体上翻译成多肽链。新生肽链必须经过一系列极其复杂的加工过程，如形成二硫键，完成糖基化、羟基化、磷酸化等化学修饰（现在已知的化学修饰反应已超过一百种），才能形成其特定的三维结构。并且，每一个新合成的多肽链都必须转运到细胞内特定的场所或者被分泌到细胞外才能发挥作用。这些转运往往需要经过一次甚至多次的跨越细胞膜结构的过程。在大多数情况下，完全折叠好的蛋白质是不能跨越膜结构的，因此如果折叠过早或过多，必须先解折叠才能跨膜运输到特定地发挥其生物功能的场所，再最终折叠成有特定空间结构的功能蛋白。另外，多亚基蛋白还要进行亚基的组装。许多以前体形式合成的蛋白，如一些蛋白酶原等，必须经过水解除去前体分子中的原序列和前序列才能转变成具有活性的酶分子。上述的全过程也称为新生肽的“成熟”。显然，这里的“折叠”不仅指肽链在空间的盘旋卷曲，而且包括广义的新生肽链的整个成熟过程，如化学修饰、跨膜转运、亚基组装和水解激活等。

1.1.1 蛋白折叠机制理论模型

蛋白质折叠是极其复杂的过程，目前能够解释折叠的模型主要有以下几种。

(1) 框架模型 (Framework Model)

框架模型^[1]假设蛋白质的局部构象依赖于局部的氨基酸序列。在多肽链折叠过程的起始阶段，先迅速形成不稳定的二级结构单元，称为闪烁集团 (flickering cluster)；随后这些二级结构靠近接触，从而形成稳定的二级结构框架；最后，二级结构框架相互拼接，肽链逐渐紧缩，形成了蛋白质的三级结构。这个模型认为即使是一个小分子蛋白也可以一部分一部分的进行折叠，其间形成的亚结构域是折叠中间体的重要结构。

(2) 疏水塌缩模型 (Hydrophobic Collapse Model)

在疏水塌缩模型^[2]中，疏水作用力被认为是在蛋白质折叠过程中起决定性作用的

因素。在形成任何二级结构和三级结构之前首先发生很快的非特异性的疏水塌缩。

(3) 扩散-碰撞-黏合机制 (Diffusion-Collision-Adhesion Model)

该模型^[3, 4]认为蛋白质的折叠起始于伸展肽链上的几个位点, 在这些位点上生成不稳定的二级结构单元或者疏水簇, 主要依靠局部序列(3~4个残基)相互作用来维系。它们以非特异性布朗运动的方式扩散、碰撞、相互黏附, 导致大的结构生成, 并因此增加了稳定性。进一步的碰撞形成具有疏水核心和二级结构的类熔球态中间体结构, 然后球形中间体调整为致密的、无活性的类似天然结构的高度有序的熔球态结构, 最后无活性的高度有序的熔球态转变为完整的有活力的天然态。

(4) 成核-凝聚-生长模型 (Nuclear-Condensation-Growth Model)

该模型^[5]认为肽链中的某一区域可以形成“折叠晶核”, 以它们为核心, 整个肽链继续折叠进而获得天然构象。所谓“晶核”实际上是由一些特殊的氨基酸残基形成的类似于天然态相互作用的网络结构, 这些残基间不是以非特异的疏水作用维系的, 而是由特异的相互作用使这些残基形成了紧密堆积。晶核的形成是折叠起始阶段的限速步骤。

(5) 拼版模型 (Jig-Saw Puzzle Model)

该模型^[6]认为多肽链可以沿多条不同的途径进行折叠。在沿每条途径折叠的过程中都是天然结构越来越多, 最终都能形成天然构象。而且沿每条途径的折叠速度都较快, 与单一途径折叠方式相比, 多途径的折叠速度更快些。另一方面, 外界生理生化环境的微小变化或突变等因素可能会给单一折叠途径造成较大的影响, 而对具有多途径的折叠方式而言, 这些变化可能给某条折叠途径带来影响, 但不会影响另外的折叠途径, 因而不会从总体上干扰多肽链的折叠。除非这些因素造成的变化太大, 以至于从根本上影响多肽链的折叠。

1.1.2 蛋白质折叠的热力学与动力学研究

研究蛋白质的折叠, 是生命科学领域的前沿课题之一。蛋白质是一种生物大分子, 基本上是由20种氨基酸以肽键连接成肽链构成蛋白质的一级结构。肽链在空间卷曲折叠成为特定的三维空间结构, 包括二级结构和三级结构两个主要层次。有的蛋白质由多条肽链组成, 每条肽链称为亚基, 亚基之间又有特定的空间关系, 称为蛋白质的四级结构。所以蛋白质分子有非常特定的复杂的空间结构。

蛋白质担负着复杂的生化反应, 同时在生物合成以后, 蛋白质本身也经历着繁杂的生理过程。蛋白质自翻译以后, 还需进行一系列的翻译后加工过程, 包括跨膜转运、修饰加工、折叠复性、生化反应、生物降解等。这些过程似乎都伴随着蛋白质的结构转换, 不但受蛋白质肽链自身的热力学稳定性所控制, 而且还受动力学过程控制。这不仅是蛋白质拓扑学因素的需要, 而且也是某些蛋白质生理功能调节所必需的。

(1) 蛋白质折叠的热力学研究

20世纪60年代, Anfinsen根据还原变性的牛胰核糖核酸酶在去除变性剂和还原剂后, 不需要任何其他物质的帮助, 能够自发地形成4对正确的二硫键, 重新折叠成天然

的三维结构,并恢复几乎全部生物活性的实验结果,提出了“多肽链的氨基酸序列包含了形成其热力学上稳定的天然构象所必需的全部信息”,或者说“一级结构决定高级结构”的著名论断^[7]。为此Anfinsen获得1972年诺贝尔化学奖。这些经典的工作开辟了近代蛋白质折叠的研究,形成了蛋白质折叠自组装(self-assembly)的主导学说。在研究新生肽链的折叠时,也很自然地把在体外蛋白质折叠研究中得到的规律推广到体内。

Anfinsen提出来的“热力学假说”认为,天然蛋白质多肽链采取的构象是在一定环境条件下热力学上最稳定的结构,采取天然构象的多肽链和它所处的一定环境条件(如溶液组分、pH、温度、离子强度等)整个系统的总自由能最低,所以处于变性状态的多肽链在一定的环境条件下能够自发折叠成天然构象。许多蛋白(特别是一些小蛋白),在体外可以可逆的进行变性、复性,使“热力学假说”得到了广泛的支持。

(2) 蛋白质折叠的动力学研究

随着对蛋白质折叠研究的深入,人们发现许多多肽链的体外复性效率较低,而且其复性速度大大低于其在体内的折叠速度。Baker等认为,对某些蛋白质而言,天然构象也许并非是多肽链自由能最低状态或唯一的低能量状态,多肽链采取的某些非天然构象也很稳定^[8]。若某一多肽链具有两种低能量状态:一种是天然构象,一种是非天然构象,而且处于这两种低能量状态的多肽链的相互转变由于要克服较高的能垒而难以实现,那么在蛋白质折叠过程中会有两种途径相互竞争:一种是正确折叠成天然构象的途径,另一种是错误折叠成稳定的非天然构象的途径。研究证实I型人类胰岛素生长因子存在两种稳定的构象,一种是天然构象,另一种是具有错配二硫键的非天然构象^[9]。处于这两种构象状态的多肽链具有相似的自由能,但二级结构的成分不同。这说明多肽链在折叠过程中实际上受到许多因素的限制作用,可见蛋白质多肽链的正确折叠是由于一些因素在蛋白质折叠的动力学过程中起到控制作用。

人们现在已分离到一些能在动力学上促进多肽链正确折叠的辅助因子。如,分子伴侣可通过与伸展多肽链结合而帮助多肽链进行正确的非共价组装;蛋白质二硫键异构酶及脯氨酸顺反异构酶可促进具有错配二硫键的多肽链进行二硫键重排,脯氨酸顺反异构酶还可促进多肽链走入正确的折叠途径。这些事实有力地说明了动力学控制在多肽链正确折叠过程中所起的重要作用及真实性。

从总体上讲,蛋白质的折叠是遵循“热力学假说”的,从高能态向低能态转变,但在这个过程中会受到动力学上的控制。热力学控制与动力学控制在蛋白多肽链的折叠反应中是统一的,在不同的蛋白质的折叠过程中所体现出来的作用大小可能有所不同。对一些小分子单结构域的蛋白质来说,折叠过程简单,在热力学控制下较易完成;而一些结构较复杂的蛋白质,特别是一些在折叠时需要二硫键重排、脯氨酸顺反异构化的蛋白质,在折叠过程中从总体上是受热力学控制,但折叠途径更重要的是受动力学的控制。

(3) 蛋白质折叠研究的新概念

相对于体外蛋白质折叠研究,细胞内新生肽链的成熟实际上是在较高的温度、较高的蛋白浓度而又十分拥挤的环境中,以极快的速度和极高的保真度在进行着。那么,是

什么机制保证了细胞内蛋白质生物合成这样高的效率呢？20世纪80年代后期，“分子伴侣”的发现使新生肽链自发折叠和组装的传统概念受到冲击而发生了很大的转变。新的观点认为，细胞内新生肽折叠和成熟为功能蛋白，一般说来是需要帮助的，而不是都能自发进行完成的。从“自组装”到“有帮助的组装”是新生肽链折叠研究在概念上的一个深刻的转变。有人说，这是一种“革命性”的转变。Anfinsen原理揭示了蛋白质的氨基酸序列决定蛋白质分子在热力学上稳定的空间结构的必然性，但并没有包含许多动力学问题在内的蛋白质折叠的全过程。要知道，Anfinsen内心里更钟爱热力学的研究方法，虽然他在热力学和动力学两方面的实验中都极其活跃。事实上，新生肽折叠和变性蛋白的重折叠需要帮助的新概念并不和Anfinsen原理相矛盾，而正是在动力学的意义上有所发展、加深和完善了蛋白质折叠的学说。用我们熟悉的语言来说，如果一级结构是肽链折叠并形成功能蛋白的特定三维结构的内因，是第一位的本质的因素，那么可以认为这些对折叠有帮助的蛋白是肽链正确折叠的外因，是条件。外因要通过内因起作用，但是如果没有适当、充分的条件，多肽链也不能折叠成为活性蛋白质。

1.1.3 蛋白质折叠的调控

在细胞内大多数天然蛋白质能自发形成比较稳定的天然结构，或被配体和代谢因子所稳定。但10%~20%新合成的多肽链需要分子伴侣的帮助才能正确折叠。此外，约有20%新合成的多肽链由于不能形成正确的三维结构而被蛋白酶降解，包括由于错误转录和翻译形成的不完全蛋白质，翻译后受到化学损伤或其他因素引起的失活、去折叠或折叠错误的蛋白质。在真核细胞中，多余的蛋白质主要通过泛素化（ubiquitination）过程降解。分子伴侣和蛋白酶系统是保证蛋白质正常功能的两大质量控制系统。

（1）分子伴侣调控

分子伴侣是与其他蛋白不稳定构象相结合并使之稳定的蛋白，它们通过控制、结合和释放来帮助被结合多肽在体内的折叠、组装、转运或降解等。分子伴侣主要分为伴侣素家族（chaperonin, Cpn）、应激蛋白70家族（Hsp70 family）、应激蛋白90家族（Hsp90 family）、核质素及T受体结合蛋白（TRAP）等。在真核细胞中，许多蛋白质在胞内合成后分泌至细胞外，在经高尔基体分泌之前这些蛋白质先转移至内质网中（endoplasmic reticulum, ER）。ER中含有大量的分子伴侣和蛋白折叠的催化剂以促进有效的折叠。这些蛋白质均严格遵守内质网质量控制机制来进行折叠。比如对于糖蛋白来说，该机制包含了一系列糖基化和脱糖基化的过程，可以防止错误折叠的蛋白质从细胞中分泌出来。分子伴侣可逆地与未折叠肽段的疏水部分结合随后松开，如此反复进行可防止错误的聚集发生，使肽链正确折叠。分子伴侣也可与错误聚集的肽段结合，使之解聚后再诱导其正确折叠。

（2）蛋白酶体系统

大部分细胞内蛋白降解均通过泛素-蛋白酶体途径。错误折叠或已损伤的蛋白质经泛素标记后被蛋白酶体所降解。泛素是由76个氨基酸组成的蛋白质，在所有类型细胞